Таблица 2

Изменение иммунологических показателей у новорожденных поросят в возрастном аспекте

Показатель	Возраст, дни				
	1	2	3	5	10
Т-лимфоциты, %	27,0±3,1	27,3±2,4	36,3±2,6	32,0±3,3	38,7±2,1
Табс., 109/л	0,64±0,05	1,17±0,10	0,99±0,26	1,16±0,29	3,04±0,71
Тх (Ттр), %	22,4±2,9	23,0±2,6	25,3±2,6	18,0±3,3	23,0±3,3
Тс (Ттч), %	4,6±0,7	4,3±0,9	11,0±0,8	14,0±3,3	15,7±1,2
Такт (ЕА-РОК), %	19,7±2,7	17,3±5,7	22,0±5,3	24,7±3,3	24,7±5,2
В-лимфоциты, %	20,3±4,5	24,3±4,0	18,7±5,7	21,7±6,6	25,0±4,2
Вабс., 109/л	0,48±0,15	1,04±0,20	0,51±0,17	0,78±0,14	1,97±0,49
Вм (Ем-РОК), %	7,3±1,4	7,7±1,7	8,0±2,9	8,7±0,9	8,0±0,8
ФАН, %	66,0±3,7	64,0±2,8	64,0±5,1	63,0±7,3	63,0±6,5
ФЧ	3,8±0,6	3,1±0,5	2,6±0,7	3,4±0,7	2,52±0,16
% перевариваемости	61,2±5,6	57,4±16,6	54,1±1,7	59,3±7,2	66,3±7,2
IgM, мг/мл	0,68±0,09	0,76±0,15	0,67±0,06	0,84±0,13	0,55±0,11
IgG, мг/мл	6,78±0,88	5,41±1,09	3,27±0,18	3,27±1,04	3,01±0,25

филов, количество которых к 10-му дню становится меньшим, чем лимфоцитов.

2. Состав лимфоцитов характеризуется достаточно высоким количеством В-лимфоцитов и низким Т-супрессоров, что способствует усилению иммунных реакций за счет более высокой концентрации и активности Т-хелперов.

3. Наиболее неблагоприятным (с точки зрения иммунной защиты) периодом является 3–5 день после рождения, когда абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов становится наиболее низким, и именно в этом возрасте у поросят отмечается угнетение фагоцитарных и переваривающих способностей нейтрофильных гранулоцитов.

РЕЗЮМЕ

Изучены особенности динамики изменений иммунно-гематологических показателей у новорожденных поросят. Установлено, что в возрасте 3–5 дней у поросят в наибольшей степени наблюдается снижение защитных возможностей организма.

SUMMARY

The features of dynamics of changes of immune-hematological parameters for the neonatal pigs are studied. Is established, that in the age of 3–5 days for the pigs are to the greatest degree watched a decrease of protective capabilities of an organism.

Литература

1. Гарт В.В. Генофонд пород свиней Западной Сибири. /В.В.Гарт// Автореф. дис. док. с.-х. наук. Новосибирск, 2006. 48с.
2. Клиническая иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов /Под ред. А.В.Караулова, М.: Медицинское информационное агентство, 1999. С.13-24.
3. Никитин В.Н. Атлас клеток крови сельскохозяйственных и лабораторных животных/ В.Н.Никитин//М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1949. С.10-29.

УДК 615.371:616.98:579.842.11:636.5

Д. А. Орехов, Ю.В. Конопатов, А.А. Сухинин, О.В. Рыбальченко

(Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербургский государственный университет)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИНОЭТИЛЭТИЛЕНИМИНА ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА ПТИЦ

Вакцинопрофилактика колибактериоза является одним из способов ликвидации данной болезни. С этой целью в настоящее время применяют инактивированные вакцины, в технологии изготовления которых одно из главных мест отводится блокиро-

ванию инфекционной активности микроорганизмов. Для инактивации используют ряд физических и химических методов обработки бактерий.

Наиболее широко применяют формалин. Однако установлено, что он не является идеальным инактиватором, так как может снижать антигенную и иммуногенную активность бактериальных антигенов. Формалин действует как консерватор, при этом соматические О-антигены могут выделяться и после распада микробных клеток. Одним из возможных подходов к решению вопроса инактивации возбудителей может быть использование азиридинов, а именно аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ), который широко применяется на практике [1-5].

Целью данного исследования являлось определение возможности использования АЭЭИ для приготовления инактивированной липосомальной вакцины против колибактериоза птиц, а также влияние АЭЭИ на морфологические и антигенные свойства бактерий.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали суспензию клеток Escherichia coli штамм №389 (О78) с концентрацией 2х10^{10} КОЕ*/$см^3$, полученный из ВГНКИ. Инактивацию осуществляли при температуре 37° С в режиме постоянного перемешивания. Концентрацию микробных клеток определяли при помощи стандарта мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Морфологические свойства интактных и инактивированных бактерий исследовали с помощью световой и электронной микроскопии. Электронно-микроскопическое исследование проводили методом позитивного окрашивания уранилацетатом, за основу которого был взят метод, описанный в [6]. Препараты просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100C (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кв. Антигенную активность определяли в реакции агглютинации (РА) по традиционной методике сразу после инактивации и через 6 месяцев при температуре хранения +4–6° С.

Для инактивации клеток E. coli использовали АЭЭИ с конечной концентрацией 2% по активному веществу, которая была подобрана по результатам предварительных опытов. Данные фиксировали через каждый час путём титрования отбираемых проб с чашек Петри со средой Эндо. В качестве адъюванта использовали сухие липосомы, состоящие из фосфолипидов растительного лецитина, бутилоксианизола (БОА), и носителей сахаров (маннита, сахарозы, лактозы, сорбита).

Подбор условий, обеспечивающих необходимое смешивание антигена и адъюванта до уровня однородной мелкодисперсной эмульсии, позволил определить оптимальный режим: гомогенизация в течение 10 минут при скорости вращения 700g и температуре смеси 22-24° С. Опыты по изучению оптимального состава и соотношения «антиген-адъювант» показали, что оптимальным являлось соотношение 10:1.

Полученные образцы жидкой липосомальной инактивированной вакцины испытывали на безвредность и антигенную активность, для этого вакцину вводили птице внутримышечно, однократно в разных дозах. Результаты сравнивали с данными, полученными при исследовании гидроокись алюминиевой (ГОА) формолвакцины.

Результаты исследований

Сравнительный анализ методом световой микроскопии окрашенных по Граму препаратов нативных и инактивированных АЭЭИ культур E. coli №389 (О78), выявил различия в форме и размерах бактериальных клеток. В мазках, приготовленных из инактивированных клеток, наряду с характерными для данного вида возбудителя палочками, отмечали структуры округлой формы более бледной окраски, которые, по всей вероятности представляли собой пустые «клеточные тени», оставшиеся после разрушения клеток.

Результаты сравнительного электронно-микроскопического анализа морфологических свойств клеток E. coli №389 (О78) до и после инактивации формалином и АЭЭИ представлены на рисунках 1, 2, 3 соответственно.

Методом позитивного окрашивания уранилацетатом установлено, что морфологические свойства клеток E. coli №389(О78) в контрольных препаратах соответствуют норме (рис. 1), о чем свидетельствует характерная форма и размеры клеток, а также наличие поверхностных структур: часть клеток снабжены пилями и жгутиками. Клетки не имели деструктивных изменений и большая часть популяции (около 97% клеток) находилась в физиологически активном состоянии.

Ультратонкое строение клеток, инактивированных формалином свидетельствует об изменении нативной структуры бактерий. На электронограмме (рис. 2) видны деструктивные изменения формы клеток, происходящие в результате сжатия белково-рибосомального компонента цитоплазмы и его преобразования в электрон-

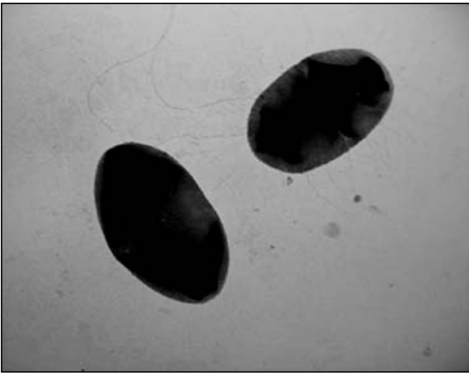


Рис. 1. Морфологически интактные клетки E. coli №389 (O78) Контроль. Увеличение × 20000

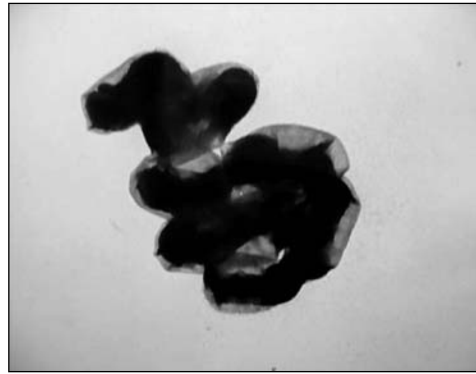


Рис. 2. Инактивированные формалином клетки E. coli №389(O78). Увеличение × 20000

но-плотные включения, при этом наблюдалось отслоение клеточной стенки от содержимого цитоплазмы. Деструкция бактерий сопровождалась уменьшением размеров и повышенной агрегацией клеток.

Морфологические свойства клеток E. coli №389(O78), инактивированных АЭЭИ, свидетельствуют о потере ими физиологической активности и переходе в электронно-плотное состояние. Однако при этом сохранялась целостность большинства бактериальных клеток. Лишь у незначительной части бактерий наблюдались деструктивные изменения, что проявлялось, в основном, в отслоении наружной и цитоплазматической мембран.

Антигенную активность определяли в реакции агглютинации через 24 часа после инактивации, затем через 6 месяцев. Активность антигенов не менялась.

Установлено, что липосомальная вакцина против колибактериоза птиц была безвредна и не вызывала нарушений в клиническом состоянии и патологоанатомических изменений в органах и тканях при введении 10-кратной дозы. Она обладала выраженной антигенной активностью и индуцировала в организме привитой птицы образование специфических антител. Динамика формирования иммунитета, представлена в таблице №2.

Все образцы вакцин были антигенноактивными в течение всего периода наблюдения, при этом и в первой и во второй группах иммунная реакция проявлялась на 7-й день после вакцинации и достигала максимальных значений к 45-м сут с момента иммунизации, стабильно удерживаясь в течение всего срока наблюдения - 3-х месяцев. Однако липосомальная вакцина обладала выраженной антигенной активностью, индуцировала образование более высокого уровня специфических антител по сравнению с ГОА формолвакциной ($P < 0.01$).

Таблица 1

Оценка антигенной активности в РА E. coli, инактивированных АЭЭИ в процессе хранения

штамм *Escherichia coli*	РА с культурой *Escherichia coli*	
	свежая	после 6 мес хранения
Escherichia coli №389 (O78)	1 : 20 – 1 : 40	1 : 10 – 1 : 20

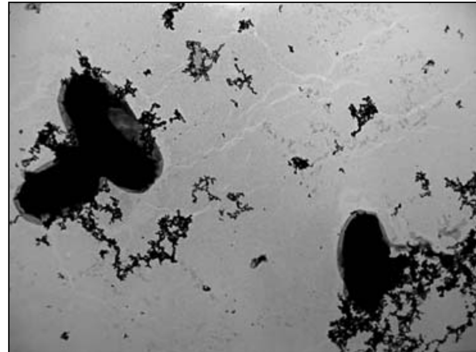


Рис.3. Инактивированные АЭЭИ клетки E. coli №389 (O78). Увеличение × 20000

В заключение следует отметить, что наиболее продолжительный и напряжённый иммунный ответ отмечен у цыплят, привитых вакцинным препаратом, в состав которого наряду с липосомальным адъювантом, входят антигены клеток E. coli №389(O78) инактивированных АЭЭИ. При этом снижение активности антигенных комплексов из клеток E. coli №389(O78) инактивированной АЭЭИ в течение всего периода исследования может быть признано незначительным.

Допустимо полагать, что на активность антигенных комплексов, в определенной мере оказывает влияние способ инактивации бактериальных клеток, По данным электронно-микроскопического анализа обработка АЭЭИ приводит к наиболее щадящим, чем воздействие формалина, изменениям в структуре клеточных стенок. На ультратонком уровне деструк-

Таблица 2

Уровень специфических антител в сыворотке крови вакцинированных цыплят, установленный в РА (титры антител в log_2(M±m))

№	Группы	Дни исследований после иммунизации				
		7	28	45	60	90
1	Липосомальная вакцина	6,1±0.2	9,4±0,3	9,7±0,2**	9,6±0,1**	9,7±0,2
2	ГОА формолвакцина	5,4±0,5	7,10,5	7,4±0.5	6,9±0,4	6,8±0,3
3	Контроль	Н/О	Н/О	Н/О	0,5±0,1	0,7±0,1

** По сравнению с контролем вакцины.
Примечание. Н/О – не обнаружено.

тивные изменения, проявляющиеся, в основном, в отслоении наружной и цитоплазматической мембран, показаны лишь у незначительной части бактерий, обработанных АЭЭИ, при этом целостность большинства клеток E. coli №389(O78) остается неизменной.

Из представленных выше данных следует, что инактивированная липосомальная вакцина по совокупности таких показателей, как безвредность и антигенная активность, является более оптимальной при специфической профилактике колибактериоза птицы, чем ГОА формолвакцина.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследования влияния аминоэтилэтиленимина на морфологические и антигенные свойства, на электронно-микроскопическом уровне проанализирован процесс инактивации клеток Escherichia coli. Установлена более выраженная антигенная активность липосомальной вакцины по сравнению с гидроокись алюминиевой формолвакциной.

SUMMARY

The results of the study of aminoethylethylenimine influence on morphology, antigenic properties and the process of Escherichia coli cells inactivation are presented in the report. The researches required were made and it was established that the liposome vaccine is more active in comparison with formaldehyde inactivated aluminium hydroxide vaccine.

Литература

1. Прунтова О.В., Русалеев В.С., Гневашев В.М., Колотилова Т.Г., Потехин А.В. Инактивация сальмонелл димером этиленимина // Биотехнология, 2001, №6, С. 43-46.
2. Ширяев Ф.А., Русалеев В.С., Гневашев В.М., Прунтова О.В., Семёнова Г.М., Городенцев А.В., Шадрова Н.Б. Инактивация бактерий Haemophilus parasuis формалином и аминоэтилэтиленимином: Материалы по теме работы круглого стола приуроченного к 80-летию академика РАСХН И.А.Бакулова. Покров: ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. 2005. С. 240-244.
3. Barteling S.J., Cassim N.I. Very fast (and safe) inactivation of foot-and- mouth disease virus and enteroviruses by a combination of binary ethylenimine and formaldehyde. Dev Biol (Basel) 2004. V.119. P. 449-455.
4. Mondal S.K., Neelima M., Seetha Rama Reddy K., Ananda Rao K., Srinivasan V.A. Validation of the inactivant binary ethylenimine for inactivating rabies virus for veterinary rabies vaccine production. Biologicals. 2005 Sep. V. 33 (3) P.185-189.
5. Brenner S., Horne R.W. A negative staining method for high resolution electron microscope of virusis \\ Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 34. № 1. P. 103-110.

А.В. Бокарев, А.А. Стекольников, Е.В. Бокарева
(Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины)

ALP-ИЗОФЕРМЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ КОСТНОЙ И ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМ СОБАК МЕТОДОМ WGA-ПРЕЦИПИТАЦИИ. ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДА

Введение

Практически любые, даже локальные, патологические изменения печени характеризуются системными проявлениями. Кроме того, одним из свойств печеночной недостаточности является неоднородность ее